

$$\text{VMS} = \frac{H \times E}{20 \times e \times F \times 1000}$$

Dabei sind: VMS = mg VMS/24 Stdn.
 H = 24 Stdn.-Harn in ml
 E = gemessene Extinktion
 e = aufgetragene Extraktmenge in ml
 F = Extinktion/ μ g VMS = 0,038

Reproduzierbarkeit und Ausbeute

8 Proben des gleichen Harnes wurden in der beschriebenen Weise getrennt aufgearbeitet und der VMS-Gehalt bestimmt. Die Standardabweichung betrug $\pm 5,5\%$. In einem weiteren Versuch wurden 8 von 10 Proben des gleichen Harnes 60–200 μ g VMS zugesetzt und alle 10 Proben in der beschriebenen Weise verarbeitet. Der in der Doppelbestimmung ermittelte Vanillinmandelsäuregehalt des ohne Zusätze verarbeiteten Harnes wurde

vom gefundenen Gesamtgehalt abgezogen. Dabei konnten durchschnittlich 99% der zugesetzten Vanillinmandelsäure wiedergefunden werden (83,5–114,8%).

Ergebnisse

Bei der Bestimmung der Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn von 71 gesunden männlichen und weiblichen Probanden im Alter von 3–64 Jahren fanden wir im Mittel eine VMS-Ausscheidung von 4,1 mg/24 Stdn. Die niedrigste Ausscheidung zeigte ein 3-jähriges Kind mit 0,9 mg, die höchste ein 28-jähriger Mann mit 8,6 mg VMS/24 Stdn. Bei mehr als 90% der untersuchten Proben lag die Ausscheidung jedoch zwischen 1,5–7,0 mg/24 Stdn. Bei 12 Patienten mit einem *Phaeochromocytom* oder *Neuroblastom* fanden wir VMS-Werte zwischen 10,8 und 142,3 (im Mittel 34,7) mg VMS/24 Stdn.

Literatur

1. ARMSTRONG, M. D. und A. McMILLAN, *Federat. Proc.* 16, 146 (1957). — 2. ARMSTRONG, M. D., A. McMILLAN und K. N. F. SHAW, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 25, 422 (1957). — 3. AXELROD, J., *Science* (Washington) 126, 400 (1957). — 4. AXELROD, J., J. K. INSCOE, S. SENOH und B. WITKOP, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 27, 210 (1958). — 5. AXELROD, J., S. SENOH und B. WITKOP, *J. biol. Chemistry* 233, 697 (1958). — 6. AXELROD, J. und R. TOMCHICK, *J. biol. Chemistry* 233, 702 (1958). — 7. AXELROD, J., *Science* (Washington) 127, 754 (1958). — 8. SOURKES, T. L., *Rev. canad. Biol.* 17, 328 (1958). — 9. GOODALL, McC., N. KIRSHNER und L. ROSEN, *J. Clin. Invest.* 38, 707 (1959). — 10. KIRSHNER, N., McC. GOODALL und L. ROSEN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 627 (1958). — 11. KRAUPP, O., H. STORMANN, H. BERNISHEIMER und H. OBENAU, *Klin. Wschr.* 37, 77 (1959). — 12. ROBINSON, R., J. RATCLIFFE und J. SMITH, *J. Clin. Path.*, London 12, 541 (1959). — 13. SUNDERMAN, F. W. jr., P. D. CLEVELAND, N. C. LAW und F. W. SUNDERMAN, *Amer. J. Clin. Path.* 34, 293 (1960). — 14. v. STUDNITZ, W., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 12, Suppl. 48 (1960). — 15. SANDLER, M. und C. R. J. RUTHVEN, *Biochem. J.* 80, 78 (1961). — 16. v. STUDNITZ, W. und A. HANSON, *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 11, 101 (1959). — 17. v. STUDNITZ, W., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 11, 309 (1959). — 18. GITLOW, S. E., M. MENDLOWITZ, S. KHASIS, G. COHEN und J. SHA, *J. Clin. Invest.* 39, 221 (1960). — 19. SCHMID, E. und N. HENNING, *Klin. Wschr.* 41, 566 (1963). — 20. STROBACH, H., A. BEIERBACH und K. GREEFF, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 251, 167 (1965). — 21. GREEFF, K. und H. STROBACH, *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* 72, (1966). — 22. BRUNJES, S., *N. England J. Med.* 271, 120 (1964).

Dipl.-Chem. Hans Strobach,
 4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5

Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel

II. Mitteilung: Die Trennung der Komponenten des Humanserums bei verschiedenen Trennstrecken

Von H. BIEL und O. ZWISLER

Aus der Behringwerke A. G., Marburg

(Eingegangen am 17. August 1966)

Der Einfluß der Wanderungsstrecke auf die Auftrennung von Humanserum und zweier Humanserumfraktionen bei Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid wurde untersucht.

The influence of the distance of migration in electrophoresis in horizontal polyacrylamide gel was studied on the fractionation of human serum and of two human serum fractions.

In einer vorhergehenden Arbeit¹⁾ untersuchten wir bei vorgegebener Trennstrecke (Abstand Auftragstelle — Präalbumin etwa 25 cm), inwieweit durch Änderung der Pufferzusammensetzung und -ionenstärke, der Gelkonzentration und dem Grad der Quervernetzung die Trennung der Komponenten des normalen Humanserums verbessert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, welchen Einfluß die Wanderungsstrecke auf die Trennung der Serumproteine besitzt.

¹⁾ ZWISLER, O. u. H. BIEL diese Z. 4, 58 (1966).

Methodik

Testsubstanzen zur Elektrophorese

Normales Humanserum Hp 2—1, Gc 1—1 = „NMS“
 Gesamt- α -Fraktion eines normalen Humanserums Hp 1—1, gewonnen durch Elektrophorese in Polyvinylchlorid = „PVCE α -Fr“
 α_2 -Fraktion eines normalen Humanserums Hp- 2—2, gewonnen durch zweimalige Elektrophorese in Polyvinylchlorid = „PVCE α_2 -Fr“

Elektrophorese in PAA-Gel

Cyanogum 41 wurde 5,5-proz. (g/Vol.) in Gelpuffer (0,0550M Tris — 0,00646M Zitronensäure — 0,00268M NaOH — 0,00813M

Tab. 1 Anzahl der Proteinkomponenten in Abhängigkeit von der Trennstrecke

Trennstrecke (Laufweg des Präalbumins)	Humanserum			Anzahl der Proteinkomponenten PVCE α -Fraktion			PVCE α_2 -Fraktion		
	Präalbumin- Transferrin	Posttrans- ferrin	Gesamt- zahl	Präalbumin- Transferrin	Posttrans- ferrin	Gesamt- zahl	Präalbumin- Transferrin	Posttrans- ferrin	Gesamt- zahl
5 cm (Mikro-Gel = Abb. 1, A)	10	11	21	9	10	19	6	12	18
9 cm (Halbmikro-Gel = Abb. 1, B)	10	11	21	9	9	18	9	12	21
27 cm (Makro-Gel = Abb. 1, C)	12	16	28	14	15	29	15	15	30
63 cm (Ultramakro-Gel = Abb. 1, D)	16	20	36	20	15	35	18	19	37

Borsäure; pH 8,7) gelöst und zu je 10 g Cyanogum 100 mg Ammoniumperoxydisulfat und 1000 mg β -Dimethylaminopropionitril unter Rühren zugegeben.

Die verwendeten Elektrophoresekammern besaßen unterschiedliche Breite und Länge, jedoch eine konstante Höhe von 3 mm. Nach Öffnen der Kammer und Herausnehmen des Agarstreifens wurden proteingetränkte Filterpapiere (Schleicher u. Schüll Nr. 2315) auf die klebrige Auftragsstelle gelegt. Die angelegte Feldstärke erhöhten wir von 2–3 V/cm bei Elektrophoresebeginn auf 7–8 V/cm nach etwa 2 Std. (die niedrige Feldstärke bei Beginn der Elektrophorese begünstigt wahrscheinlich das Einwandern der Proteine ins Gel). Die Verbindung zu den Elektrodengefäßen erfolgte mit elektrodenpuffergetränkten (0,12M NaOH–0,6M Borsäure) Filterpapieren. Auftretende *Joule'sche* Wärme wurde bisweilen durch Auflegen eines wassergetränkten Filterpapiers auf die Elektrophoresekammer abgeführt (Transpirationsskühlung). Die Laufzeit betrug für das 14 cm lange Halbmikrogel 3–4 Std., für das 34 cm lange Makrogel 15–17 und das 74 cm lange Ultramakrogel 24–28 Std.

Ergebnisse und Diskussion

Es ist zu erwarten, daß durch den Siebeffekt des PAA-Gels bei längerer Trennstrecke Komponentengemische aufgelöst werden, die bei kurzem Laufweg noch als einheitlich erscheinen. Deshalb führten wir mit Humanserum und zwei daraus gewonnenen Fraktionen Versuche auf Gelen mit 8, 14, 34 und 74 cm Länge durch. Die Entfernung des Präalbumins von der Auftragsstelle betrug dabei 5, 9, 27 und 63 cm. Bei dem Vergleich der Abbildungen der einzelnen Elektrophoreseläufe (Abb. 1) ist am auffälligsten die zunehmende Auffächerung im Präalbuminbereich bei den Gelen mit größerer Wanderungstrecke. Die Anzahl der Komponenten ist, wie Tabelle 1 zeigt, bei der Trennung im Mikro-Gel (= 5 cm) und Halbmikro-Gel (= 9 cm) etwa gleich und

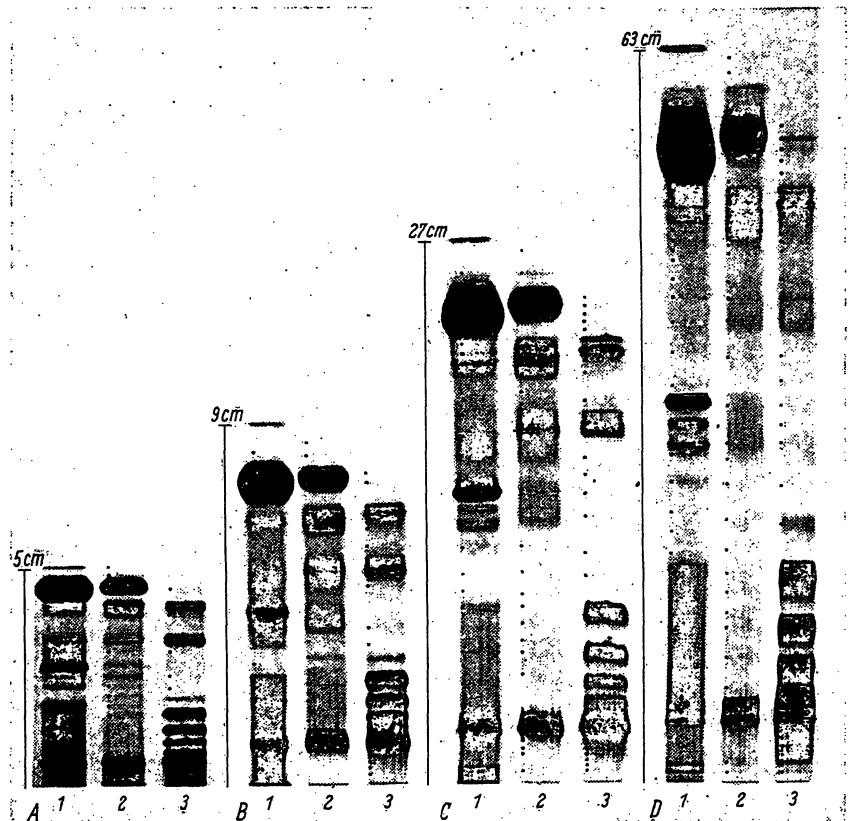


Abb. 1

Elektrophorese von 1 = NMS, 2 = PVCE α -Fr. und 3 = PVCE α_2 -Fr. im A = Mikro-, B = Halbmikro-, C = Makro- und D = Ultramakro-Gel

Aufgetragen wurden bei A: 175 — 70 — 70 μ g

B: 525 — 210 — 210 μ g

C: 1050 — 420 — 420 μ g

D: 3150 — 1250 — 1250 μ g Protein pro cm

steigt bei dem Ultramakro-Gel (= 63 cm) auf knapp das Doppelte. Im Durchschnitt nimmt dabei die Auffächerung des Präalbumin-Transferrinbereiches etwas mehr zu als die des Posttransferrinbereiches. Gegenüber dem Mikro-Gel mit 8 Komponenten im Präalbumin-Transferrin- und 11 im Posttransferrin-Bereich zeigt das Makro- im Schnitt 14 bzw. 15 und das Ultramakro-Gel jeweils 18 Banden.

Demnach erscheint es zweckmäßig, PAA-Gel-Elektrophoresen mit kurzer Trennstrecke (Entfernung Präalbumin-Auftragsstelle bis zu 10 cm) möglichst nur zu orientierenden Versuchen einzusetzen, jedoch zu Reinheitsprüfungen, besonders bei geringfügigen Unterschieden in der Wanderungsgeschwindigkeit, die Trennstrecke nicht unter 25 cm zu halten.

Dr. O. Zwisler, Behringwerke A. G., 355 Marburg/Lahn-1, Postfach 167